

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 798 672

(21) N° d'enregistrement national :

99 11663

(51) Int Cl⁷ : C 12 N 9/08, C 07 K 16/40, G 01 N 33/53, 33/68,
A 61 P 25/00, 35/00, 37/00

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 17.09.99.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE Etablissement de caractère scientifique technique et industriel — FR.

(43) Date de mise à la disposition du public de la demande : 23.03.01 Bulletin 01/12.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : Se reporter à la fin du présent fascicule

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(72) Inventeur(s) : RABILLOUD THIERRY.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : CABINET ORES.

(54) FORMES ACIDES DES PEROXYREDOXINES ET LEUR UTILISATION COMME MOYEN DE DIAGNOSTIC.

(57) Formes acides purifiées des peroxyrédoxines et les fragments de celles-ci, caractérisés en ce qu'ils comprennent, dans une région proche de leur site actif, la séquence SEQ ID N° 2 suivante:

Pro X1 Asp Phe Thr X2 Val X4 X3 Thr Glu
dans laquelle X1 représente n'importe quel acide aminé naturel, X2 représente un acide aminé choisi dans le groupe constitué par la phénylalanine et la proline, X3 représente un acide aminé choisi dans le groupe constitué par la proline et la thréonine et X4 représente un acide cystéine souffrant ou un acide cystéique (acide cystéine sulfonique). Utilisation comme moyen de diagnostic et en thérapeutique.

FR 2 798 672 - A1



La présente invention a pour objet les formes acides des peroxyrédoxines et leur utilisation comme moyen de diagnostic.

Le phénomène de mort cellulaire programmée (apoptose), joue un rôle important dans la vie des organismes multicellulaires.

5 Ce phénomène de mort cellulaire intervient au cours du développement embryonnaire normal, par exemple pour éliminer les neurones surnuméraires, ou dans l'élimination des cellules immunitaires autoréactives.

10 En revanche, une mort cellulaire anormale, non programmée, existe dans de nombreuses pathologies, notamment dans les pathologies neurodégénératives, inflammatoires et cardiaques. Cette mort cellulaire peut être accélérée, par exemple en cas d'ischémie ou d'athérosclérose, ou au contraire, les cellules peuvent échapper à cette mort cellulaire, par exemple dans le cas de maladies auto immunes ; cette absence de mort cellulaire explique également le caractère malin de certaines pathologies comme les cancers.

15 Ainsi ce phénomène oxydant est impliqué dans la mort cellulaire induite par des composés chimiques ou biologiques (Degli Espoti M. *et al.* (1998), *FEBS Lett.* **430**, 338-342 ; Quillet-Mary A. *et al.* (1997), *J. Biol. Chem.*, **272**, 21388-21395), dans le syndrome d'ischémie-reperfusion (Parkins C. S. *et al.* (1998), *Free Radic. Res.*, **28**, 271-281) ou dans la génération des plaques d'athérome en cas 20 d'athérosclérose (Aviram M. *et al.* (1998), *Mol. Cell. Biochem.*, **188**, 149-159).

25 Une des étapes importantes de la mort cellulaire ou apoptose est le phénomène de stress oxydant qui peut être défini comme l'action des espèces réactives oxygénées (superoxydes, peroxydes, hydroperoxydes et radicaux hydroxyles) ou des espèces réactives nitro-oxygénées (oxydes d'azote et peroxynitrites) sur les molécules biologiques telles que les lipides, les protéines et les acides nucléiques.

30 Outre l'apparition des espèces réactives mentionnées précédemment, le phénomène de stress oxydant dépend d'un autre facteur, à savoir la destruction de ces espèces chimiques réactives par des systèmes de protection cellulaire. Ces systèmes font intervenir soit des molécules réductrices comme la vitamine A et la vitamine E, soit des systèmes enzymatiques comme les superoxydes dismutases, les catalases et les peroxydases.

Parmi les peroxydases, se trouvent les peroxydases dépendantes du glutathion et les peroxydases dépendantes de la thiorédoxine.

35 Les peroxydases dépendantes de la thiorédoxine (TPx), également appelées peroxyrédoxines, ont été initialement découvertes dans les levures (Kim K. *et al.* (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 4704-4711) puis chez le rat (Kim I. *et al.* (1989), *Proc.*

5 *Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6018-6122) et se sont révélées hautement conservées à travers les espèces, y compris chez l'homme. Ce sont des antioxydants qui protègent les molécules biologiques contre l'oxydation et qui fonctionnent comme peroxydases, uniquement lorsqu'elles sont couplées à la thiorédoxine ou à un intermédiaire 5 contenant un thiol (Pahl, P. *et al.* (1995), *Genomics*, **26**, 602-606).

Les peroxyrédoxines sont caractérisées par la présence, dans la région bordant leur site actif, de la séquence SEQ ID N° 1 suivante :

Pro X1 Asp Phe Thr X2 Val Cys X3 Thr Glu

10 dans laquelle X1 représente n'importe quel acide aminé naturel, X2 représente la phénylalanine ou la proline et X3 représente une proline ou une thréonine.

15 Leur rôle dans la cellule est à l'heure actuelle très mal connu mais plusieurs hypothèses ont été émises. Ainsi la demande internationale WO 98/43666 qui décrit une nouvelle protéine appartenant à la famille des peroxyrédoxines, appelée AOP2, suggère que cette protéine pourrait jouer un rôle dans la protection contre l'athérosclérose.

20 Récemment certains auteurs ont montré (Zhang P. *et al.* (1997), *J. Biol. Chem.*, **272**, 30615-30618) que la thiorédoxine peroxydase de mammifère (TPx II) est un puissant inhibiteur de l'apoptose due à l'apparition d'espèces oxygénées réactives dans des cellules leucémiques Molt-4 traitées par des agents chimiques comme les céramides ou l'étoposide.

25 D'autres auteurs (Kang S.W. *et al.* (1998), *J. Biol. Chem.*, **273**, 6297-6302) ont montré que les différentes isoformes cytosoliques des peroxyrédoxines de mammifères (Prx I, Prx II) diminuent la quantité de peroxyde d'hydrogène induit par les facteurs de croissance ou le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), suggérant que ces enzymes joueraient un rôle non seulement dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène, mais participeraient également au signal des facteurs de croissance et du TNF- α .

30 Or les Inventeurs ont montré de manière surprenante que lorsqu'un stress oxydant est induit, *in vitro*, par un agent chimique dans des cellules en culture, il apparaît des formes acides des peroxyrédoxines, qui sont caractéristiques de la 35 présence de ce stress.

35 Ces formes acides, caractérisées par un point isoélectrique plus acide que celui des formes normales des peroxyrédoxines correspondantes, résultent d'une modification directe des peroxyrédoxines et non pas d'une altération du gène codant pour lesdites peroxyrédoxines.

De plus les Inventeurs ont montré que, dans le cas d'un stress intense mais de courte durée, la quantité totale de peroxyrédoxines ne varie pas alors que le rapport entre la forme acide et la forme native est augmenté par ledit stress.

5 Aussi les Inventeurs se sont donnés pour but de pourvoir aux formes acides purifiées des peroxyrédoxines, à l'utilisation de ces formes acides ou du rapport entre les formes natives et les formes acides des peroxyrédoxines comme moyen de diagnostic.

10 Ce moyen de diagnostic est simple à mettre en œuvre, rapide, et permet de mettre en évidence de manière fiable, la présence d'un désordre métabolique lié à un stress oxydant, même si ce stress est de courte durée.

La présente invention a en conséquence pour objet les formes acides purifiées des peroxyrédoxines et des fragments de celles-ci, caractérisés en ce qu'ils comprennent, dans une région proche de leur site actif, la séquence SEQ ID N° 2 suivante :

15 Pro X1 Asp Phe Thr X2 Val X4 X3 Thr Glu
dans laquelle

X1 représente n'importe quel acide aminé naturel,

X2 représente un acide aminé choisi dans le groupe constitué par la phénylalanine et la proline,

20 X3 représente un acide aminé choisi dans le groupe constitué par la proline et la thréonine et

X4 représente un acide cystéine sulfinique ou un acide cystéique (acide cystéine sulfonique),

ainsi que leurs équivalents fonctionnels.

25 Au sens de la présente invention, on entend par formes acides purifiées des peroxyrédoxines et des fragments de celles-ci, aussi bien les formes naturelles, que les fragments synthétiques obtenus par les techniques classiques de synthèse peptidique, et notamment par la technique de synthèse en phase solide décrite par Merrifield R. B. (1963), *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149-2154 ou par des techniques d'ADN recombinant (Corti, A., et al. (1997) *Eur. J. Biochem.* **248**, 692-699) ou par combinaison de ces deux types de techniques.

30 Au sens de la présente invention, on entend par équivalents fonctionnels, des séquences d'aminoacides comprenant des délétions, ou des additions, des modifications ou des substitutions conservatives ou une combinaison de celles-ci, au niveau de un ou plusieurs aminoacides, de manière à ce que la structure tertiaire et l'activité antioxydante ne soient pas altérées.

Les modifications comprennent notamment celles résultant des processus posttraductionnels ou des modifications chimiques réalisées par des techniques classiques connues de l'homme du métier (acylation, fixation de lipides, de nucléotides, cyclisation ...).

5 Les modifications comprennent également celles résultant d'un couplage des peptides, par des liaisons covalentes, ioniques ou faibles à une molécule susceptible d'augmenter leur affinité pour un type de cellule particulier, notamment des couplages avec des peptides vecteurs.

10 Les substitutions conservatives bien connues de l'homme du métier, comprennent notamment la substitution d'un aminoacide par un autre aminoacide ayant même charge (aminoacides acides : Asp et Glu ; aminoacides basiques : Lys, Arg et ornithine ; aminoacides polaires neutres : Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, His et Trp), même taille, même caractère hydrophile (aminoacides hydrophobes : Ala, Val, Leu Ile, Pro, Phe et Met), même aromaticité (Phe et Tyr) et/ou même capacité à former 15 des hélices.

Il est bien entendu que les équivalents fonctionnels comprennent également comme aminoacides, ceux qui sont des énantiomères et des diastéréoisomères des aminoacides naturels de conformation D, les aminoacides rares, notamment l'hydroxyproline, la méthyllysine et la diméthyllysine et les aminoacides 20 synthétiques, notamment l'ornithine, la norleucine, la cyclohexylalanine et les oméga-aminoacides. Les équivalents fonctionnels recouvrent également les rétropeptides.

Dans un mode de réalisation particulier de réalisation de l'invention, ces peroxyrédoxines sont choisies dans le groupe constitué par les peroxyrédoxines de mammifères humains ou non.

25 Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, les formes acides sont celles de TDX 1 d'origine humaine (SEQ ID N° 3), TDX M d'origine humaine (SEQ ID N° 4), TDX N d'origine humaine (SEQ ID N° 5), AOP 2 d'origine humaine (SEQ ID N° 6) et TDX 2 d'origine humaine (SEQ ID N° 7), ainsi que leur fragments comprenant la SEQ ID N° 2.

30 La présente invention a également pour objet des anticorps immunospécifiques dirigés contre les formes acides des peroxyrédoxines.

Dans un mode particulier de réalisation desdits anticorps, ils sont choisis dans le groupe constitué par des anticorps polyclonaux et des anticorps monoclonaux.

35 Dans un autre mode particulier de réalisation desdits anticorps, ils sont dirigés contre les formes acides des peroxyrédoxines choisies dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5 et SEQ ID N° 6 et SEQ ID N° 7.

Les anticorps polyclonaux peuvent être obtenus par immunisation d'un animal approprié (notamment un mammifère ou un gallinacé) avec la forme acide d'une peroxyrédoxine selon l'invention, éventuellement couplée à une protéine convenablement choisie telle que la sérum albumine bovine (SAB) ou la KLH (*Kyu limpet hemocyanin*), notamment selon les techniques décrites par Goumon Y. *et. al.* (1998), *J. Biol. Chem.*, **273**, 29847-29856 et par El-Majdoubi M., (1996), *J. Neuro. Cytol.*, **25**, 405-416.

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus de manière connue en soi, notamment par fusion des cellules spléniques de souris immunisées avec un 10 antigène consistant en la forme acide d'une peroxyrédoxine telle que définie ci-dessus, éventuellement couplée à une protéine convenable telle que SAB ou KLH avec des cellules myéломateuses appropriées.

La présente invention a également pour objet un réactif pour la détection et/ou le dosage des formes acides des peroxyrédoxines selon l'invention, 15 caractérisé en ce qu'il comprend au moins un anticorps spécifique des formes acides des peroxyrédoxines.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection des formes acides des peroxyrédoxines selon l'invention, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend une étape dans laquelle on met en contact 20 l'échantillon biologique avec un réactif conforme à l'invention et une étape dans laquelle on détecte une interaction spécifique entre ledit réactif et les formes acides des peroxyrédoxines telles que définies ci-dessus et présentes dans l'échantillon.

La présente invention a également pour objet un procédé pour déetecter et/ou doser les formes acides des peroxyrédoxines selon l'invention, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend une étape dans laquelle on 25 sépare les formes acides et les formes natives des peroxyrédoxines, suivant leur point isoélectrique, puis suivant leur poids moléculaire et une étape dans laquelle on détecte et/ou on dose lesdites formes acides.

Au sens de la présente invention un échantillon biologique est choisi 30 dans le groupe comprenant notamment le cœur, les artères, la peau, les muscles, le cerveau, les poumons, la rate, le sang, les cellules sanguines, la moelle, le colon, l'intestin l'œsophage, l'estomac, et l'urine.

Dans un mode particulier de mise en oeuvre de ce procédé, il comprend en plus le dosage des formes natives des peroxyrédoxines et la 35 détermination du rapport entre la forme acide et entre la forme native de chaque peroxyrédoxine.

Dans un autre mode particulier de mise en oeuvre de ce procédé, la détection et/ou le dosage des formes acides et des formes natives des peroxyrédoxines peuvent être réalisés par toute technique connue de l'homme du métier, notamment par la technique colorimétrique décrite par T. Rabilloud *et al.* (*Electrophoresis*.(1998), 5 19, 1006-1014).

Dans un autre mode de mise en oeuvre particulier de ce procédé, la séparation des formes acides et des formes natives des peroxyrédoxines, suivant leur point isoélectrique peut être réalisée par tout moyen connu de l'homme du métier, notamment par les techniques de focalisation isoélectrique telle que celle décrite par T. 10 Rabilloud *et al.* (*Electrophoresis*.(1997), 18, 307-316).

Dans un autre mode particulier de mise en oeuvre de ce procédé, la détection et/ou le dosage des formes acides et natives des peroxyrédoxines, après séparation, peuvent être réalisés avec un anticorps capable de se lier à la fois aux formes natives et aux formes acides des peroxyrédoxines; notamment avec un 15 anticorps tel que ceux décrits dans la demande internationale WO 98/43666.

Dans un autre mode particulier de mise en oeuvre de ce procédé, la détection et/ou le dosage des formes acides et natives des peroxyrédoxines sont réalisés avec des anticorps spécifiques de chaque forme.

Pour la mise en oeuvre des différents procédés de détection et/ou de 20 dosage selon l'invention, les anticorps peuvent être fixés sur un support solide et les peroxyrédoxines détectées et/ou dosées par compétition ou par une méthode sandwich.. Dans ce cas, pour détecter la liaison antigène/anticorps, on utilise des marqueurs appropriés ou d'autres anticorps eux-mêmes conjugués à des marqueurs convenables, lesdits autres anticorps étant des anticorps classiquement 25 utilisés, tels que par exemple, une IgG dirigée contre le deuxième anticorps et produite notamment chez la chèvre, le porc ou l'âne.

Parmi les marqueurs utilisés, on peut citer à titre d'exemple les 30 marqueurs fluorescents, le système biotine/streptavidine, les marqueurs non isotopiques ou des enzymes, comme par exemple la peroxydase de raifort ou la phosphatase alcaline.

La présente invention a également pour objet un procédé de dépistage d'un trouble métabolique lié au stress oxydant, caractérisé en ce que l'on détermine, *in vitro*, dans un échantillon biologique, le rapport entre les formes acides et les formes natives des peroxyrédoxines.

35 La présente invention a également pour objet un coffret ou trousse de diagnostic pour mettre en oeuvre ledit procédé de dépistage, caractérisé en ce qu'il

comprend au moins un anticorps spécifique des formes acides des peroxyrédoxines et au moins un anticorps choisi dans le groupe constitué par les anticorps capables de se lier à la fois aux formes natives et aux formes acides des peroxyrédoxines et les anticorps spécifiques des formes natives des peroxyrédoxines, des moyens de détection appropriés et au moins un témoin constitué par un échantillon de référence.

La présente invention a également pour objet une méthode pour sélectionner *in vitro*, des composés aptes à stimuler la formation des formes acides des peroxyrédoxines, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en contact des formes natives des peroxyrédoxines avec un agent provoquant un stress oxydant, en présence ou en absence d'un composé susceptible de stimuler ladite formation,
- le dosage des formes acides formées,
- éventuellement le dosage des formes natives des peroxyrédoxines et la mesure du rapport entre les formes acides et les formes natives des peroxyrédoxines.

La présente invention a également pour objet une méthode pour sélectionner *in vitro*, des composés aptes à inhiber la formation des formes acides des peroxyrédoxines, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en contact des formes natives des peroxyrédoxines avec un agent provoquant un stress oxydant, en présence ou en absence d'un composé susceptible d'inhiber ladite formation,
- le dosage des formes acides formées,
- éventuellement le dosage des formes natives des peroxyrédoxines et la mesure du rapport entre les formes acides et les formes natives des peroxyrédoxines.

Pour la mise en oeuvre de ces méthodes de sélection, les peroxyrédoxines, sous formes natives, peuvent être en solution ou fixées sur des supports ou exprimées dans des cellules convenablement choisies.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une molécule apte à stimuler la formation des formes acides des peroxyrédoxines pour la préparation d'un médicament favorisant la mort cellulaire.

Dans un mode particulier de mise en oeuvre de cette utilisation, le médicament est un anticancéreux ou est utilisable dans le traitement des maladies auto immunes.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une molécule apte à inhiber la formation des formes acides des peroxyrédoxines pour la préparation d'un médicament inhibant la mort cellulaire.

Dans un mode particulier de mise en oeuvre de cette utilisation, le médicament est utile dans le traitement des troubles neurodégénératifs.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description et des exemples illustrés par les figures dans lesquelles :

5 - la figure 1 représente l'effet d'un stress oxydant induit par du *tert*-butyl-hydroperoxyde dans des fibroblastes embryonnaires humains non transformés (souche GM10 déposée auprès du NIGMS *Coriell Cell Repositories*, Canden, New Jersey) - 1A correspond à la forme acide de la peroxyrédoxine 1 d'origine humaine (TDX 1) ; 1B correspond à la forme native de la peroxyrédoxine 1 d'origine humaine (TDX 1) ; 2A correspond à la forme acide de la peroxyrédoxine 10 d'origine humaine, TDX N ; 2B correspond à la forme native de la peroxyrédoxine d'origine humaine, TDX N ; 3A correspond à la forme acide de la peroxyrédoxine 3 d'origine humaine, (TDX M) ; 3B correspond à la forme native de la peroxyrédoxine 3 d'origine humaine (TDX M) ; 4A correspond à la forme acide de la peroxyrédoxine 15 d'origine humaine, AOP 2 ; 4B correspond à la forme native de la peroxyrédoxine, AOP 2 – (1a) “ extrait cellulaire contrôle ” correspond à des cellules non traitées et (1b) “ extrait cellulaire BHP ” correspond à des cellules traitées par du *tert*-butyl-hydroperoxyde selon la méthode décrite dans l'exemple 1,

20 - la figure 2 représente la quantité relative des formes acides et natives des peroxyrédoxines exprimée en pourcentage des protéines totales, et la détermination du rapport forme acide sur forme native pour différentes peroxyrédoxines dans des fibroblastes embryonnaires humains non transformés (souche GM10) témoins ou traités par du *tert*-butyl-hydroperoxyde (stress oxydant) selon la méthode décrite dans l'exemple 1,

25 - la figure 3 représente l'effet d'un stress oxydant induit par du *tert*-butyl-hydroperoxyde dans des hématies - 1A correspond à la forme acide de la peroxyrédoxine 1 d'origine humaine (TDX 1) ; 1B correspond à la forme native de la peroxyrédoxine 1 d'origine humaine (TDX 1) ; (3a) “ extrait cellulaire contrôle ” correspond à des hématies non traitées et (3b) “ extrait cellulaire BHP ” correspond à des hématies traitées par du *tert*-butyl-hydroperoxyde selon la méthode décrite dans l'exemple 1,

30 - la figure 4 illustre la détection par un anticorps de la forme acide de TDX 1 (1A) et de la forme native de TDX 1 (1B) dans des lymphocytes T humains, cellules Jurkat (souche déposée à l'*American Type Culture Collection* sous le n° ATCC : TIB 152), après séparation des deux formes par électrophorèse bidimensionnelle réalisée selon la méthode décrite dans l'exemple 1,

- la figure 5 représente la quantité relative des formes acides et natives des peroxyrédoxines exprimées en pourcentage des protéines totales et la détermination du rapport forme acide sur forme native pour différentes peroxyrédoxines dans des cellules Jurkat traitées par de l'antimycine A en présence 5 ou non de phénylbutylnitroné comme antioxydant. La colonne "anti A" correspond aux cellules traitées par l'antimycine A seulement. La colonne "anti A + PNB" correspond aux cellules traitées par l'antimycine A et la phénylbutylnitroné selon l'exemple 4.

10 **Exemple 1 : Effet du stress oxydant sur les peroxyrédoxines.**

1. Matériel et méthodes

1.1. Séparation en électrophorèse bidimensionnelle

Les protéines cellulaires sont extraites par un mélange contenant 8 M d'urée, 2 M de thiourée, 4 % (p/v) de CHAPS (Cholamidopropyl diméthylammonio propane sulfonate), 40 mM de dithiothreitol et 20 mM de spermine sous forme de base. Après centrifugation à 200 000 g pendant 30 minutes pour éliminer les acides nucléiques, l'extrait est déposé sur une bandelette de gel de polyacrylamide (200x3x0,5 mM) incluant un gradient de pH immobilisé (de pH 4 à 20 pH 8) et contenant 8 M d'urée, 2 M de thiourée, 4 % (p/v) de CHAPS, 10 mM de dithiothreitol et 0,4 % (p/v) d'ampholytes porteurs couvrant l'intervalle de pH 3-10.

Les protéines sont séparées sous l'effet d'un champ électrique (70 000 V.h) et migrent jusqu'à leur point isoélectrique. Après cette séparation, la bandelette de polyacrylamide est imprégnée pendant 30 minutes par un tampon Tris 125 mM, HCl 100 mM contenant 6 M d'urée et 2 % (p/v) de dodécylique sulfate de sodium. La bandelette ainsi imprégnée est placée au sommet d'un gel de polyacrylamide (concentration 10 % p/v) et les protéines sont soumises à une électrophorèse de zone en présence de dodécylique sulfate de sodium. Les protéines sont ensuite révélées sur le gel de polyacrylamide par coloration argentique selon la technique décrite par T. Rabilloud *et al.* (1998) (référence citée).

30 1.2. Mesure du stress oxydant

Des cellules humaines en culture (souche GM10) sont cultivées dans un milieu DMEM (*Dubelcco's modified Eagles medium*).

Deux heures avant la récolte des cellules, du *tert*-butyl hydroperoxyde est ajouté dans le milieu à une concentration finale de 0,15 mM. Après 35 cette période de deux heures, les cellules sont récoltées, lavées avec une solution

saline, puis lysées en présence de cholamidopropyl dimethyl ammonio propane sulfonate à 40 g/l, d'urée 420 g/l, de thiourée 150 g/l et de dithiothréitol 1,5 g/l.

Le lysat cellulaire est ensuite analysé par électrophorèse bidimensionnelle selon la méthode décrite précédemment.

5 La nature des protéines ayant les points isoélectriques et masses moléculaires correspondant à ceux des peroxyrédoxines (formes natives et acides) est confirmée par carte peptidique massique après digestion à la trypsine des protéines séparées sur le gel bidimensionnel.

2. Résultats

10 Ils sont illustrés à la figure 1 et à la figure 2.

Lorsque les cellules ont été soumises à un stress oxydant, on observe une diminution des taches correspondant aux formes natives des différentes peroxyrédoxines (1B figure 1b et figure 2).

15 Bien que la quantité totale de peroxyrédoxines reste globalement identique en l'absence ou en présence d'un stress oxydant, le rapport entre les deux formes est augmenté de manière significative dans les cellules ayant été soumises à n stress oxydant.

Exemple 2 : Effet du stress oxydant sur la peroxyrédoxine de globules rouges.

20 1. Matériel et méthodes

Des globules rouges humains sont suspendus dans 10 fois leur volume de milieu RPMI 1640 (*Rockwell Park Memorial Institute*) et le *tert*-butyl hydroperoxyde est ajouté dans le milieu à une concentration finale de 0,3 mM.

25 Après deux heures d'incubation, les globules rouges sont séparés du milieu réactionnel par centrifugation et rincés dans du tampon PBS salin (*phosphate buffered saline*).

Finalement les protéines sont extraites et séparées comme décrit à l'exemple 1.2.

2. Résultats

30 Ils sont illustrés à la figure 3.

Lorsque les hématies ont été soumises à un stress oxydant, on observe une diminution de la tache correspondant à la forme native de la peroxyrédoxine 1 (1B figures 3A et 3B) et une augmentation de la tache correspondant à la forme acide de la peroxyrédoxine 1 (1A figures 3A et 3B).

Exemple 3 : Détermination du rapport entre les formes acides et natives des peroxyrédoxines au moyen d'un anticorps.

1. Matériel et méthodes

Des protéines de cellules Jurkat en culture sont extraites et séparées
5 comme décrit dans l'exemple 1.

Après séparation, les protéines sont transférées sur membrane de poly(difluorure de vinylidène). Cette membrane est ensuite mise en contact avec un anticorps polyclonal réalisé chez le lapin et dirigé contre la peroxyrédoxine 1, puis après rinçage, avec un conjugué de peroxydase et de protéine A de *Staphylococcus aureus*.
10

La peroxyrédoxine 1 est détectée au moyen de l'activité enzymatique de la peroxydase.

2. Résultats

Ils sont illustrés à la figure 4.

15 L'utilisation d'un anticorps apte à se lier à la fois à la forme active et à la forme acide de la peroxyrédoxine 1 permet de quantifier la quantité de chacune des formes et de déterminer le rapport entre les deux formes.

Exemple 4 : Détermination du rapport entre les formes acides et natives des peroxyrédoxines après un stress oxydant par l'antimycine A et mesure de l'effet d'un antioxydant, la phénylbutylnitron.

1. Matériel et méthodes

Des cellules Jurkat en culture sont cultivées pendant 24 heures dans un milieu RPMI 1640 contenant 26 μ M d'antimycine A, 300 μ M de phénylbutylnitron.
25

Finalement les protéines sont extraites et séparées comme décrit à l'exemple 1.2.

2. Résultats

Ils sont illustrés à la figure 5.

30 En présence d'un agent antioxydant, le rapport entre les formes acides et les formes natives des peroxyrédoxines est diminué.

35 L'ensemble de ces résultats montrent que la détermination du rapport entre les formes acides et natives des peroxyrédoxines permet de détecter de manière simple et fiable la présence d'un stress oxydant et donc d'être utilisé comme marqueur de la présence d'un désordre métabolique lié à un stress oxydant.

REVENDICATIONS

1. Formes acides purifiées des peroxyrédoxines et les fragments de celles-ci, caractérisés en ce qu'ils comprennent, dans une région proche de leurs site actif, la séquence SEQ ID N° 2 suivante :

5 Pro X1 Asp Phe Thr X2 Val X4 X3 Thr Glu
dans laquelle
X1 représente n'importe quel acide aminé naturel,
X2 représente un acide aminé choisi dans le groupe constitué par la phénylalanine et la proline,
10 X3 représente un acide aminé choisi dans le groupe constitué par la proline et la thréonine et
X4 représente un acide cystéine sulfinique ou un acide cystéique (acide cystéine sulfonique),
15 ainsi que leurs équivalents fonctionnels.

2. Formes acides purifiées selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont issues de mammifères humain ou non.

3. Formes acides purifiées selon les revendications 1 ou 2, caractérisées en ce qu'elles ont choisies dans le groupe constitué par la TDX 1 20 d'origine humaine (SEQ ID N° ID N° 3), TDX M d'origine humaine (SEQ ID N° 4), TDX N d'origine humaine (SEQ ID N° 5), AOP 2 d'origine humaine (SEQ ID N° 6) et TDX 2 d'origine humaine (SEQ ID N° 7), ainsi que leur fragments comprenant la SEQ ID N° 2.

4. Anticorps immunospécifiques caractérisés en ce qu'ils sont dirigés 25 contre les formes acides des peroxyrédoxines selon la revendication 1.

5. Anticorps immunospécifiques, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre les formes acides des peroxyrédoxines choisies dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6 et SEQ ID N° 7.

30 6. Anticorps selon la revendication 4 ou la revendication 5, caractérisés en ce qu'ils sont choisis dans le groupe constitué par des anticorps polyclonaux et des anticorps monoclonaux.

7. Réactif pour détecter et/ou doser des formes acides des peroxyrédoxines, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un anticorps selon l'une 35 quelconque des revendications 4 à 6.

8. Procédé pour détecter et/ou doser les formes acides des

peroxyrédoxines, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend une étape dans laquelle on met en contact l'échantillon biologique avec un réactif selon la revendication 7 et une étape dans laquelle on détecte une interaction spécifique entre ledit réactif et les formes acides des peroxyrédoxines présentes dans l'échantillon.

5 9. Procédé pour détecter et/ou doser les formes acides des peroxyrédoxines, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend une étape dans laquelle on sépare les formes acides et les formes natives des peroxyrédoxines, suivant leur point isoélectrique, puis suivant leur poids moléculaire et une étape dans laquelle on détecte et/ou on dose lesdites formes acides présentes dans l'échantillon.

10 10. Procédé pour détecter et/ou doser les formes acides des peroxyrédoxines, selon la revendication 9, caractérisé en ce que la séparation des formes acides et des formes natives des peroxyrédoxines, suivant leur point isoélectrique est réalisée par focalisation isoélectrique.

15 11. Procédé pour détecter et/ou doser les formes acides des peroxyrédoxines, selon les revendications 9 ou 10, caractérisé en ce qu'il comprend en plus la détection des formes natives des peroxyrédoxines et la détermination du rapport entre les formes acides et les formes natives des peroxyrédoxines.

20 12. Procédé pour détecter et/ou doser les formes acides des peroxyrédoxines, selon la revendication 11, caractérisé en ce que la détection et/ou le dosage des formes acides et natives des peroxyrédoxines sont réalisés avec des anticorps capables de se lier à la fois à la forme native et à la forme acide, après séparation des deux formes.

25 13. Procédé pour détecter et/ou doser les formes acides des peroxyrédoxines, selon la revendication 11, caractérisé en ce que la détection et/ou le dosage des formes acides et natives des peroxyrédoxines sont réalisés avec des anticorps spécifiques de chaque forme.

30 14. Procédé de dépistage d'un trouble métabolique lié au stress oxydant, caractérisé en ce que l'on détermine, *in vitro* dans un échantillon biologique, le rapport entre les formes acides et les formes natives des peroxyrédoxines.

35 15. Coffret ou trousse de diagnostic pour mettre en oeuvre le procédé de dépistage selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un anticorps spécifique des formes acides des peroxyrédoxines et au moins un anticorps capable de se lier à la fois aux formes natives et aux formes acides des peroxyrédoxines ou au moins un anticorps spécifique des formes natives des

peroxyrédoxines, des moyens de détection appropriés et au moins un témoin constitué par un échantillon de référence.

5 16. Méthode pour sélectionner *in vitro*, des composés aptes à stimuler la formation des formes acides des peroxyrédoxines, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en contact des formes natives des peroxyrédoxines avec un agent provoquant un stress oxydant, en présence ou en absence d'un composé susceptible de stimuler ladite formation,
- 10 - le dosage des formes acides formées,
- éventuellement le dosage des formes natives des peroxyrédoxines et la mesure du rapport entre les formes acides et les formes natives des peroxyrédoxines.

17. Méthode pour sélectionner *in vitro*, des composés aptes à inhiber la formation des formes acides des peroxyrédoxines, caractérisée en ce qu'elle comprend :

15 - la mise en contact des formes natives des peroxyrédoxines avec un agent provoquant un stress oxydant, en présence ou en absence d'un composé susceptible d'inhiber ladite formation,

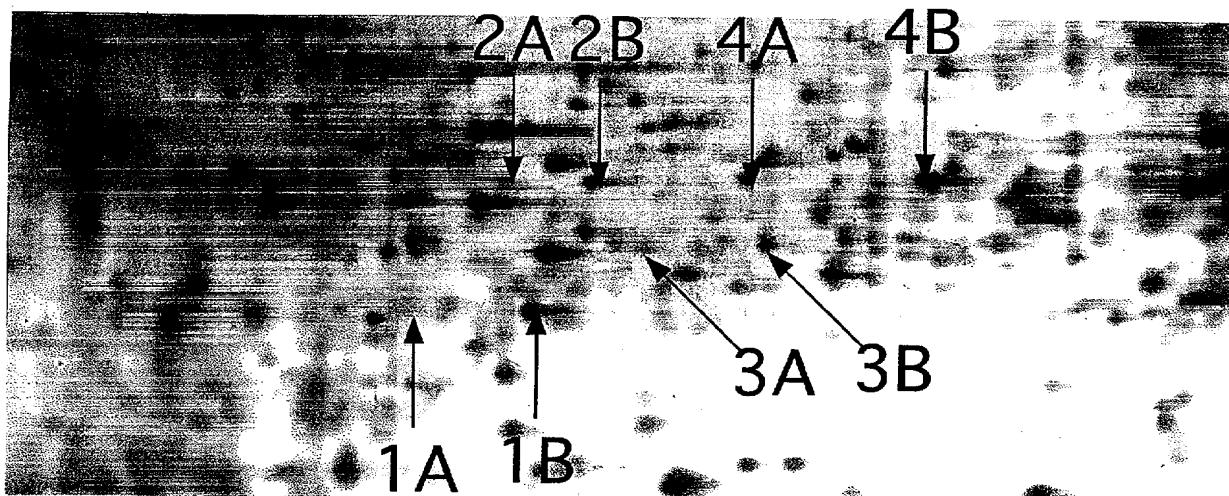
- le dosage des formes acides formées,
- éventuellement le dosage des formes natives des peroxyrédoxines et la 20 mesure du rapport entre les formes acides et les formes natives des peroxyrédoxines.

18. Utilisation d'une molécule apte à stimuler la formation des formes acides des peroxyrédoxines pour la préparation d'un médicament favorisant la mort cellulaire.

25 19. Utilisation selon la revendication 18, caractérisée en ce que le médicament est un anticancéreux ou est utilisable dans le traitement des maladies auto immunes.

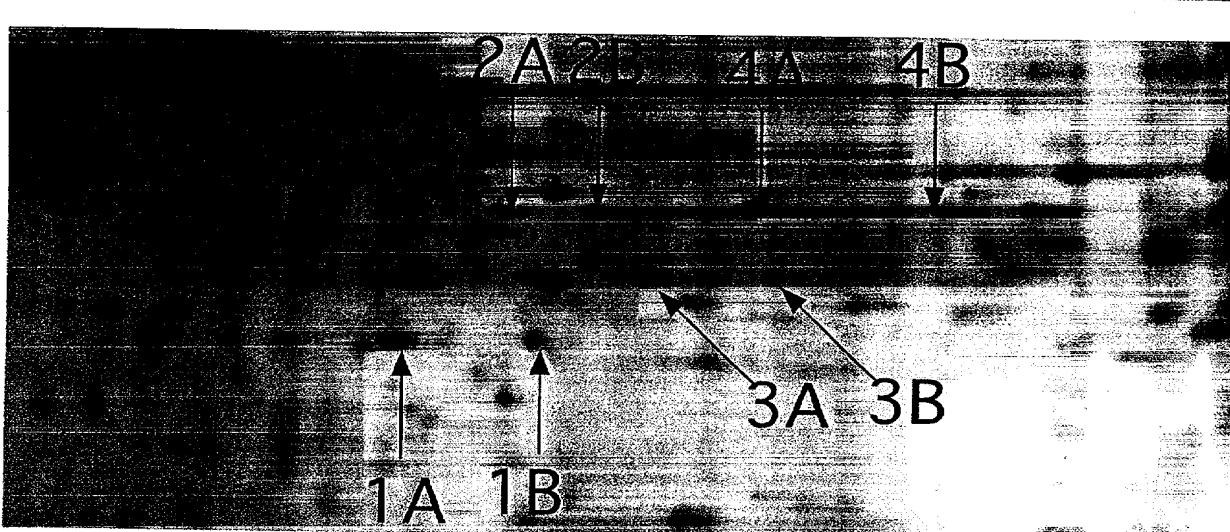
20. Utilisation d'une molécule apte à inhiber la formation des formes acides des peroxyrédoxines pour la préparation d'un médicament inhibant la mort cellulaire.

30 21. Utilisation selon la revendication 20, caractérisée en ce que le médicament est utile dans le traitement des troubles neurodégénératifs.



extrait cellulaire contrôle

FIGURE 1a

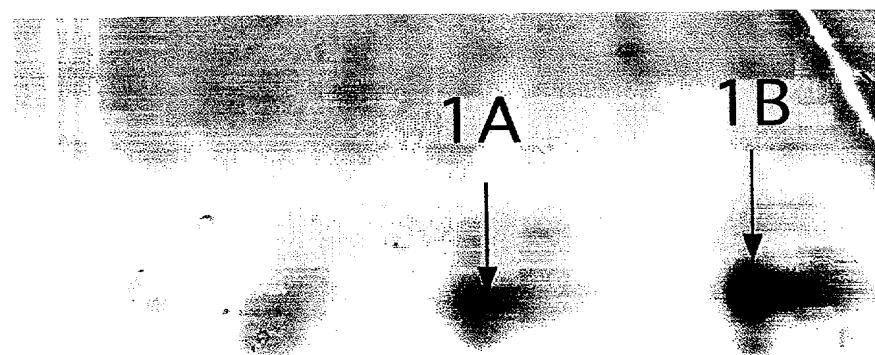


extrait cellulaire traité BHP

FIGURE 1b

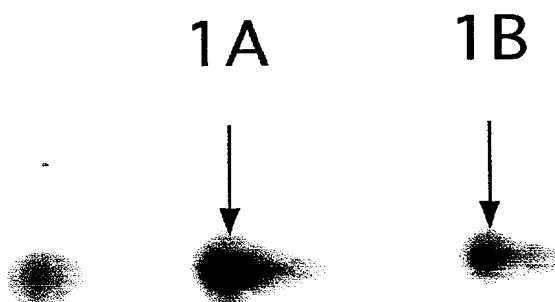
TYPE DE PEROXYREDOXINE	TEMOIN	RAPPORT	STRESS OXYDANT	RAPPORT
TDX1 native	0,341	0,12	0,097	2,5
TDX1 acide	0,043		0,246	
TDXM native	0,066	0,54	0,038	2,18
TDXM acide	0,036		0,083	
TDXN native	0,110	0,35	0,117	0,52
TDXN acide	0,039		0,062	
ULA6 native	0,247	0,26	0,068	1,47
ULA6 acide	0,065		0,100	

FIGURE 2



extrait cellulaire contrôle

FIGURE 3a



extrait cellulaire traité BHP

FIGURE 3b

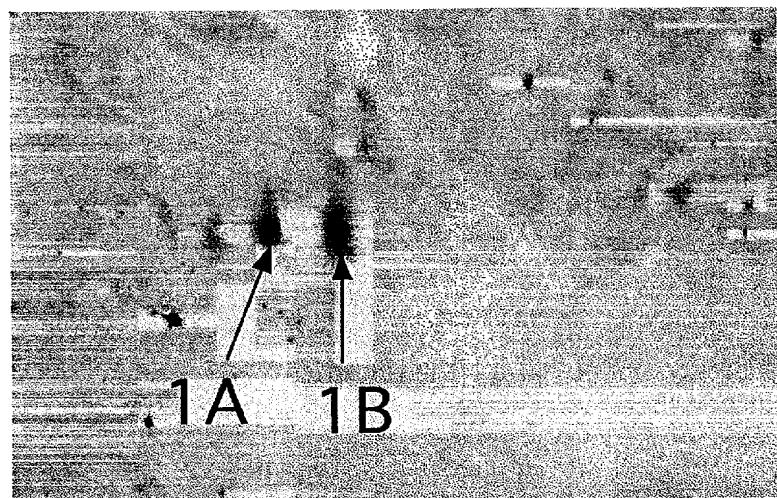


FIGURE 4

TYPE DE PEROXYREDOXINE	JURKAT ANTI A	RAPPORT	JURKAT ANTI A + PBN	RAPPORT
TDX1 native	0,192	0,31	0,360	0,21
TDX1 acide	0,060		0,079	
TDXM native	0,175	0,54	0,132	0,28
TDXM acide	0,094		0,083	
TDXN native	0,067	0,22	0,027	0,14
TDXN acide	0,015		0,004	

FIGURE 5

LISTE DE SEQUENCES

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

<120> FORMES ACIDES DES PEROXYREDOXINES ET LEUR UTILISATION
COMME MOYEN DE DIAGNOSTIC

<130> s263FR57

<140>
<141>

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<223> X1 représente n'importe quel acide aminé naturel,
X2 représente Phe ou Pro, X3 représente Pro ou Thr

<400> 1
Pro X1 Asp Phe Thr X2 Val Cys X3 Thr Glu
1 5 10

<210> 2
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> X1 représente n'importe quel acide aminé naturel,
X2 représente Phe ou Pro, X3 représente Pro ou Thr
et X4 représente un acide sulfinique ou un acide
cystéique

<400> 2
Pro X1 Asp Phe Thr X2 Val X3 X4 Thr Glu
1 5 10

<210> 3
<211> 198
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Met Ala Ser Gly Asn Ala Arg Ile Gly Lys Pro Ala Pro Asp Phe Lys
1 5 10 15
Ala Thr Ala Val Val Asp Gly Ala Phe Lys Glu Val Lys Leu Ser Asp
20 25 30

Tyr Lys Gly Lys Tyr Val Val Leu Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr
 35 40 45
 Phe Val Cys Pro Thr Glu Ile Ile Ala Phe Ser Asn Arg Ala Glu Asp
 50 55 60
 Phe Arg Lys Leu Gly Cys Glu Val Leu Gly Val Ser Val Asp Ser Gln
 65 70 75 80
 Phe Thr His Leu Ala Trp Ile Asn Thr Pro Arg Lys Glu Gly Gly Leu
 85 90 95
 Gly Pro Leu Asn Ile Pro Leu Leu Asp Val Thr Arg Arg Leu Ser
 100 105 110
 Glu Asp Tyr Gly Val Leu Lys Thr Asp Glu Gly Ile Ala Tyr Arg Gly
 115 120 125
 Leu Phe Ile Ile Asp Gly Lys Gly Val Leu Arg Gln Ile Thr Val Asn
 130 135 140
 Asp Leu Pro Val Gly Arg Ser Val Asp Glu Ala Leu Arg Leu Val Gln
 145 150 155 160
 Ala Phe Gln Tyr Thr Asp Glu His Gly Glu Val Cys Pro Ala Gly Trp
 165 170 175
 Lys Pro Gly Ser Asp Thr Ile Lys Pro Asn Val Asp Asp Ser Lys Glu
 180 185 190
 Tyr Phe Ser Lys His Asn
 195

<210> 4
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Ala Ala Ala Val Gly Arg Leu Leu Arg Ala Ser Val Ala Arg His
 1 5 10 15
 Val Ser Ala Ile Pro Trp Gly Ile Ser Ala Thr Ala Ala Leu Arg Pro
 20 25 30
 Ala Ala Cys Gly Arg Thr Ser Leu Thr Asn Leu Leu Cys Ser Gly Ser
 35 40 45
 Ser Gln Ala Lys Leu Phe Ser Thr Ser Ser Cys His Ala Pro Ala
 50 55 60
 Val Thr Gln His Ala Pro Tyr Phe Lys Gly Thr Ala Val Val Asn Gly
 65 70 75 80
 Glu Phe Lys Asp Leu Ser Leu Asp Asp Phe Lys Gly Lys Tyr Leu Val
 85 90 95
 Leu Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu Ile
 100 105 110

Val Ala Phe Ser Asp Lys Ala Asn Glu Phe His Asp Val Asn Cys Glu
 115 120 125
 Val Val Ala Val Ser Val Asp Ser His Phe Ser His Leu Ala Trp Ile
 130 135 140
 Asn Thr Pro Arg Lys Asn Gly Gly Leu Gly His Met Asn Ile Ala Leu
 145 150 155 160
 Leu Ser Asp Leu Thr Lys Gln Ile Ser Arg Asp Tyr Gly Val Leu Leu
 165 170 175
 Glu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Arg Gly Leu Phe Ile Ile Asp Pro Asn
 180 185 190
 Gly Val Ile Lys His Leu Ser Val Asn Asp Leu Pro Val Gly Arg Ser
 195 200 205
 Val Glu Glu Thr Leu Arg Leu Val Lys Ala Phe Gln Tyr Val Glu Thr
 210 215 220
 His Gly Glu Val Cys Pro Ala Asn Trp Thr Pro Asp Ser Pro Thr Ile
 225 230 235 240
 Lys Pro Ser Pro Ala Ala Ser Lys Glu Tyr Phe Gln Lys Val Asn Gln
 245 250 255

<210> 5
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Met Glu Ala Leu Pro Leu Leu Ala Ala Thr Thr Pro Asp His Gly Arg
 1 5 10 15
 His Arg Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Phe Leu Leu Pro Ala
 20 25 30
 Gly Ala Val Gln Gly Trp Glu Thr Glu Glu Arg Pro Arg Thr Arg Glu
 35 40 45
 Glu Glu Cys His Phe Tyr Ala Gly Gly Gln Val Tyr Pro Gly Glu Ala
 50 55 60
 Ser Arg Val Ser Val Ala Asp His Ser Leu His Leu Ser Lys Ala Lys
 65 70 75 80
 Ile Ser Lys Pro Ala Pro Tyr Trp Glu Gly Thr Ala Val Ile Asp Gly
 85 90 95
 Glu Phe Lys Glu Leu Lys Leu Thr Asp Tyr Arg Gly Lys Tyr Leu Val
 100 105 110

Phe	Phe	Phe	Tyr	Pro	Leu	Asp	Phe	Thr	Phe	Val	Cys	Pro	Thr	Glu	Ile
115							120							125	
Ile	Ala	Phe	Gly	Asp	Arg	Leu	Glu	Glu	Phe	Arg	Ser	Ile	Asn	Thr	Glu
130							135							140	
Val	Val	Ala	Cys	Ser	Val	Asp	Ser	Gln	Phe	Thr	His	Leu	Ala	Trp	Ile
145							150				155			160	
Asn	Thr	Pro	Arg	Arg	Gln	Gly	Gly	Leu	Gly	Pro	Ile	Arg	Ile	Pro	Leu
								165			170			175	
Leu	Ser	Asp	Leu	Thr	His	Gln	Ile	Ser	Lys	Asp	Tyr	Gly	Val	Tyr	Leu
							180		185				190		
Glu	Asp	Ser	Gly	His	Thr	Leu	Arg	Gly	Leu	Phe	Ile	Ile	Asp	Asp	Lys
							195		200				205		
Gly	Ile	Leu	Arg	Gln	Ile	Thr	Leu	Asn	Asp	Leu	Pro	Val	Gly	Arg	Ser
							210		215				220		
Val	Asp	Glu	Thr	Leu	Arg	Leu	Val	Gln	Ala	Phe	Gln	Tyr	Thr	Asp	Lys
							225		230				235		240
His	Gly	Glu	Val	Cys	Pro	Ala	Gly	Trp	Lys	Pro	Gly	Ser	Glu	Thr	Ile
							245		250				255		
Ile	Pro	Asp	Pro	Ala	Gly	Lys	Leu	Lys	Tyr	Phe	Asp	Lys	Leu	Asn	
							260		265				270		

<210> 6
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6															
Pro	Gly	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Asp	Val	Ala	Pro	Asn	Phe	Glu	Ala	Asn
1							5					10			15
Thr	Thr	Val	Gly	Arg	Ile	Arg	Phe	His	Asp	Phe	Leu	Gly	Asp	Ser	Trp
							20				25			30	
Gly	Ile	Leu	Phe	Ser	His	Pro	Arg	Asp	Phe	Thr	Pro	Val	Cys	Thr	Thr
							35				40			45	
Glu	Leu	Gly	Arg	Ala	Ala	Lys	Leu	Ala	Pro	Glu	Phe	Ala	Lys	Arg	Asn
							50				55			60	
Val	Lys	Leu	Ile	Ala	Leu	Ser	Ile	Asp	Ser	Val	Glu	Asp	His	Leu	Ala
							65				70			75	
Trp	Ser	Lys	Asp	Ile	Asn	Ala	Tyr	Asn	Cys	Glu	Glu	Pro	Thr	Glu	Lys
							85				90			95	
Leu	Pro	Phe	Pro	Ile	Ile	Asp	Asp	Arg	Asn	Arg	Glu	Leu	Ala	Ile	Leu
							100				105			110	
Leu	Gly	Met	Leu	Asp	Pro	Ala	Glu	Lys	Asp	Glu	Lys	Gly	Met	Pro	Val
							115				120			125	

Thr	Ala	Arg	Val	Val	Phe	Val	Phe	Gly	Pro	Asp	Lys	Lys	Leu	Lys	Leu
130					135						140				
Ser	Ile	Leu	Tyr	Pro	Ala	Thr	Thr	Gly	Arg	Asn	Phe	Asp	Glu	Ile	Leu
145					150						155			160	
Arg	Val	Val	Ile	Ser	Leu	Gln	Leu	Thr	Ala	Glu	Lys	Arg	Val	Ala	Thr
					165				170			175			
Pro	Val	Asp	Trp	Lys	Asp	Gly	Asp	Ser	Val	Met	Val	Leu	Pro	Thr	Ile
					180				185			190			
Pro	Glu	Glu	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Phe	Pro	Lys	Gly	Val	Phe	Thr	Lys
					195				200			205			
Glu	Leu	Pro	Ser	Gly	Lys	Lys	Tyr	Leu	Arg	Tyr	Thr	Pro	Gln	Pro	
					210			215			220				

<210> 7
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400>	7														
Met	Ser	Ser	Gly	Asn	Ala	Lys	Ile	Gly	His	Pro	Ala	Pro	Asn	Phe	Lys
1					5				10					15	
Ala	Thr	Ala	Val	Met	Pro	Asp	Gly	Gln	Phe	Lys	Asp	Ile	Ser	Leu	Ser
					20			25			30				
Asp	Tyr	Lys	Gly	Lys	Tyr	Val	Val	Phe	Phe	Phe	Tyr	Pro	Leu	Asp	Phe
					35			40			45				
Thr	Phe	Val	Cys	Pro	Thr	Glu	Ile	Ile	Ala	Phe	Ser	Asp	Arg	Ala	Glu
					50			55			60				
Glu	Phe	Lys	Lys	Leu	Asn	Cys	Gln	Val	Ile	Gly	Ala	Ser	Val	Asp	Ser
					65			70			75			80	
His	Phe	Cys	His	Leu	Ala	Trp	Val	Asn	Thr	Pro	Lys	Lys	Gln	Gly	Gly
					85			90			95				
Leu	Gly	Pro	Met	Asn	Ile	Pro	Leu	Val	Ser	Asp	Pro	Lys	Arg	Thr	Ile
					100			105			110				
Ala	Gln	Asp	Tyr	Gly	Val	Leu	Lys	Ala	Asp	Glu	Gly	Ile	Ser	Phe	Arg
					115			120			125				
Gly	Leu	Phe	Ile	Ile	Asp	Asp	Lys	Gly	Ile	Leu	Arg	Gln	Ile	Thr	Val
					130			135			140				
Asn	Asp	Leu	Pro	Val	Gly	Arg	Ser	Val	Asp	Glu	Thr	Leu	Arg	Leu	Gln
					145			150			155			160	
Ala	Phe	Gln	Phe	Thr	Asp	Lys	His	Gly	Glu	Val	Cys	Pro	Ala	Gly	Trp
					165			170			175				

Lys Pro Gly Ser Asp Thr Ile Lys Pro Asp Val Gln Lys Ser Lys Glu
180 185 190

Tyr Phe Ser Lys Gln Lys
195

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 581858
FR 9911663

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO 97 29766 A (TRIPP CYNTHIA ANN ; HESKA CORP (US); KLIMOWSKI LAURA (US)) 21 août 1997 (1997-08-21) * abrégé * * page 73 * * revendication 20 * ---	1-17
X	WO 93 08827 A (UNIV CALIFORNIA) 13 mai 1993 (1993-05-13) * abrégé * * page 28 * * revendication 4 * ---	1-17
D, X	WO 98 43666 A (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL ; JACKSON LAB (US)) 8 octobre 1998 (1998-10-08) * le document en entier * ---	1-17
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1999, no. 04, 30 avril 1999 (1999-04-30) & JP 11 004690 A (RES DEV CORP OF JAPAN), 12 janvier 1999 (1999-01-12) * abrégé * ---	1-17
X	WO 96 39424 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ; NI JIAN (US); ROSEN CRAIG A (US); GENTZ) 12 décembre 1996 (1996-12-12) * abrégé * * revendication 1; figure 1 * ---	1-17
		-/-
3		
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
14 juin 2000		Panzica, G
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou antérieure-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREN° d'enregistrement
nationalFA 581858
FR 9911663établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
E	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 200001 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2000-012791 XP002140148 * abrégé *</p> <p>& US 5 985 612 A (NI JAN ET AL.) 16 novembre 1999 (1999-11-16) * abrégé; revendication 1; figure 1 *</p> <p>-----</p>	1-17
E		1-17
DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.7)		
3		
Date d'achèvement de la recherche 14 juin 2000		Examinateur Panzica, G
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		